

**Untersuchungen über die Abhängigkeit
der Harnkallikreinausscheidung von einigen
den Blutdruck regelnden Faktoren**

Hilmar Heutelbach

1973

aus dem Besitz der kaiserlichen Bibliothek und kaiserlichen Hochschule
der Universität München

Stempel 1918, 24. Mr. 7. 1918

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ANORDNUNG DER MONUMENTEN-
UND DENKMÄLER VON KUNST UND KULTUR DER VORZEIT

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für klinische Chemie und klinische Biochemie
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ABHÄNGIGKEIT DER HARNKALLIKREIN-
AUSSCHIEDUNG VON EINIGEN DEN BLUTDRUCK REGELNDEN FAKTOREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Hilmar Heutelbach

aus

München

1973



Prüfungsausschuss

4. Schriftlicher Teil

1. Die pharmakologische Wirkung des Kaliumsalzes
2. Die Chemie des Toffenstoffs
3. Funktionen des Toffenstoffs
4. Die pharmakologische Bedeutung des Toffenstoffs und seine Anwendung

5. Mündlicher Teil

1. Aufgaben des Mediziner
2. Die wichtigsten Arzneimittel
3. Die wichtigsten Arzneimittel
4. Die wichtigsten Arzneimittel

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

1. Die pharmakologische Wirkung des Kaliumsalzes
2. Die Chemie des Toffenstoffs
3. Funktionen des Toffenstoffs
4. Die pharmakologische Bedeutung des Toffenstoffs und seine Anwendung
5. Die pharmakologische Bedeutung des Toffenstoffs und seine Anwendung
6. Die pharmakologische Bedeutung des Toffenstoffs und seine Anwendung
7. Die pharmakologische Bedeutung des Toffenstoffs und seine Anwendung
8. Die pharmakologische Bedeutung des Toffenstoffs und seine Anwendung
9. Die pharmakologische Bedeutung des Toffenstoffs und seine Anwendung
10. Die pharmakologische Bedeutung des Toffenstoffs und seine Anwendung

Berichterstatte: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 12. 1973

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A EINFÜHRUNG	
1. Die pharmakologische Wirkung des Kallikreins	1
2. Zur Chemie des Kallikreins	2
3. Vorkommen der Kallikreine	3
4. Zur physiologischen Bedeutung des Kallikreins und Problemstellung	5
B EXPERIMENTELLER TEIL	
I. Definition der Einheiten	
1. Die biologische Kallikreineinheit	6
2. Die enzymatische Kallikreineinheit	6
3. Inhibitor Einheiten	7
II. Bestimmungsmethoden	
1. Die spektrophotometrische Bestimmung des Harnkallikreins	8
a) bei Ratten	10
b) beim Menschen	13
2. Die biologische Bestimmung des Harnkallikreins	15
3. Die Bestimmung der Vanillinmandelsäure im Harn	16
4. Die Bestimmung von Normetanephrin und Meta- nephrin im Harn	20
5. Die Bestimmung der Harnelektrolyte Na^+ K^+ Ca^{++}	25
III. Klinische Untersuchungen beim Menschen und Er- läuterung zur statistischen Überprüfung der Er- gebnisse	26

	Seite
IV. Tierversuche	28
1. bei Ratten	28
a) Versuch mit Reserpin	28
b) Versuch mit α -Methyl-dopa	28
c) Versuch mit kochsalzreicher Ernährung	29
d) Erläuterung zur statistischen Überprüfung der Ergebnisse bei Ratten	29
2. Versuche bei Hunden	31
a) Versuch mit Adrenalin und Orciprenalin	31
b) Versuche mit Angiotensin II	32
c) Versuche mit Aldosteron	33
C ERGEBNISSE	34
I. Ergebnisse der Untersuchungen beim Menschen	34
1. Harnkallikrein- und Metanephrinausscheidung	34
2. Harnkallikrein und Vanillinmandelsäureausscheidung	35
3. Harnkallikrein und Elektrolyte, Natrium, Kalium und Calcium	36
II. Ergebnisse der Untersuchungen bei Ratten	37
1. Versuche mit Reserpin	37
2. Versuch mit α -Methyl-dopa	39
3. Versuch mit kochsalzreicher Ernährung	41
III. Ergebnisse der Untersuchungen bei Hunden	43
1. Versuche mit Adrenalin und Orciprenalin	43
2. Versuche mit Angiotensin II	44
3. Versuche mit Aldosteron	45

	Seite
D DISKUSSION	47
E ZUSAMMENFASSUNG	54
F LITERATUR	55

A EINFÜHRUNG

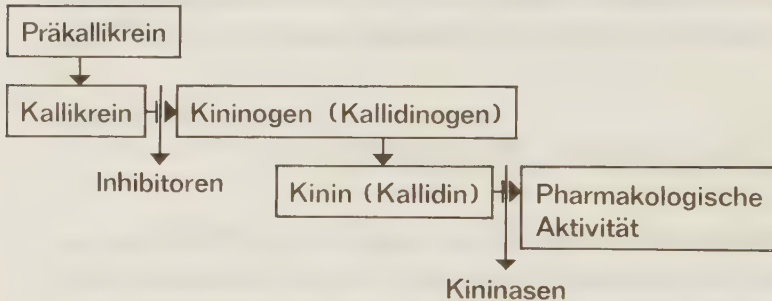
Kallikrein ist eine hochspezifische Proteinase, welche aus einem α_2 Globulin des Blutplasmas, das nach neueren Untersuchungen in der Leber gebildet wird, ein niedermolekulares Peptid freisetzt, das alle pharmakologischen Eigenschaften besitzt, die früher dem Kallikrein zugeschrieben wurden.^{4) 5)}

1. Die pharmakologische Wirkung des Kallikreins

Wird Kallikrein intravenös injiziert, kommt es zu einer Erniedrigung des peripheren Widerstandes durch mäßige Erweiterung des peripheren Strombettes. Dieser Effekt bedingt eine Senkung des mittleren arteriellen Blutdruckes, die weitgehend der injizierten Kallikreinmenge proportional ist.

Wird Serum mit Kallikrein inkubiert, so wird bei i. v. Injektion des Ansatzes eine wesentlich größere Blutdrucksenkung erzielt, als der zugesetzten Menge Kallikrein entspricht. Gleichzeitig wird die darmkontrahierende Substanz Kallidin aus seiner Vorstufe Kallidinogen freigesetzt. Weitere in ihrer Struktur und Wirkung ähnliche Substanzen werden durch Kallikrein aktiviert und als Kinine bezeichnet. Ihre Vorstufen heißen demnach Kininogene. Die Kinine werden durch Peptidasen, die auch als Kininasen bezeichnet werden, abgebaut. Kallikrein selbst wird durch spezifische Hemmstoffe (Inhibitoren) wie dem Kallikreininhibitor aus Rinderorganen Trasylol[®] reversibel inaktiviert.^{4) 5)}

Im folgenden Schema wird der Wirkmechanismus des Kallikrein-Kinin-Systems veranschaulicht.



2. Zur Chemie des Kallikreins

Die Kallikreine aus verschiedenen Organen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Molekulargewichts, das zwischen etwa 25.000 und 50.000 liegt. Sie werden durch Alkalien, Säuren, Oxydationsmittel, UV-Licht und hohe Temperaturen zerstört. Kallikreine können in reiner Form isoliert werden,¹⁴⁾ jedoch sind Strukturaufklärungen bisher noch nicht durchgeführt worden. Sie sind löslich in Wasser, verdünntem Alkohol und verdünntem Aceton. Die Kallikreine werden nach Denaturierung durch proteolytische Fermente angegriffen und abgebaut. Durch Cellophanmembranen sind sie nicht dialysierbar.

N^{α} Benzoyl-L-argininäthylester wird durch die esterolytische Wirkung der Kallikreine in N^{α} Benzoyl-L-arginin und Äthanol gespalten. Diese Eigenschaft wird bei der spektrophotometrischen Bestimmung der Kallikreine ausgenutzt.

3. Vorkommen der Kallikreine

Eingehende Untersuchungen über das Vorkommen der Kallikreine liegen vor beim Menschen, den Säugetieren und Vögeln. Als Vorstufe kommt das Enzym inaktiv (Präkallikrein) im Pankreas, Magen, Darmschleimhaut und Blutplasma vor. Aktives Kallikrein findet sich in den Mundspeicheldrüsen und im Harn.^{4) 5)} Von besonderer Bedeutung ist hier das Vorkommen des Kallikreins im Harn, weil es offenbar einen Parameter für seine auf die Niere bezogene Funktion darstellt.

Die tägliche Kallikreinausscheidung unterliegt großen Schwankungen. Eine tägliche Ausscheidung von 120 bis 320 KE (siehe Definition der Einheiten) liegt im Normalwertbereich. In 1 ml Harn werden im allgemeinen 0,15 bis 0,25 KE gefunden.¹²⁾

Die Bildung des Harnkallikreins findet mit großer Wahrscheinlichkeit in der Niere statt. Würde es sich um Kallikrein aus anderen Organen handeln, würde es auf dem Blutweg in die Niere gelangen. Im Blut wird jedoch nur Präkallikrein gefunden (15 000 - 20 000 KE im Gesamtblut). Es ist allerdings zu bedenken, daß die tägliche Ausscheidung von ca. 200 KE nur etwa 1 % der im Blut vorhandenen Menge Präkallikrein entspricht und es somit möglich wäre, daß sich diese geringen Mengen aktiven Kallikreins im Serum eines Nachweises entziehen.⁵⁾

Patienten mit akuter Pankreatitis, bei denen Pankreas-Kallikrein ins Serum übertritt, scheiden nicht vermehrt Kallikrein aus. Ebenso wenig ruft eine In-

fusion von 100 KE Pankreaskallikrein (Padutin[®]) eine Erhöhung der Harnkallikreinausscheidung beim Menschen hervor.⁵⁾ Es wird außerdem darauf hingewiesen, daß sich Harnkallikrein bezüglich seines Hemmspektrums durch verschiedene Inhibitoren und seines Molekulargewichtes (ca. 40 000) von anderen Kallikreinen unterscheidet.^{6) 10) 17) 27)}

Neuere Untersuchungen lassen genauer auf den Ort der Synthese in der Niere schließen.

Durch selektive Schädigung der proximalen Nierentubuli bei Ratten mittels Salyrgan, Uranylacetat oder Spermin konnten E. Werle und R. Vogel ein Absinken der täglichen Harnkallikreinausscheidung herbeiführen.³¹⁾

Nach Homo- und Heterotransplantationen der Niere bei Hund und Mensch werden durch die Abwehrreaktionen des Empfängerorganismus die Nierentubuli zerstört. E. Werle, R. Busse und A. Schmal zeigten, daß das Absinken der täglichen Kallikreinausscheidung im Harn ein vorzeitiger Hinweis auf eine Nierenschädigung durch eine Abstoßungskrise ist.^{29) 30)}

Diese Befunde lassen vermuten, daß sich die Bildungsstätte des Harnkallikreins im proximalen Tubulusepithel der Niere befindet, zumindest aber, daß die Ausscheidung durch dieses erfolgt.

4. Zur physiologischen Bedeutung des Kallikreins und Problemstellung

Obwohl sehr viele Einzelbefunde erarbeitet wurden, können endgültige Aussagen über die physiologische Bedeutung des Kallikreins nicht gemacht werden.

Margolius et al. fanden neuerdings, daß bei sekundärer Hypertonie, bei Phäochromozytom und primärem Hyperaldosteronismus eine Erhöhung der täglichen Kallikreinausscheidung zu beobachten ist.¹⁶⁾

Von anderen Autoren wird angenommen, daß dem Harnkallikrein eine bedeutende Rolle bei der Natriurese zukommt. So beobachteten Webster und Gilmore (1964), daß Kinine die Nierendurchblutung erhöhen und zu einer starken Natriurese führen.²⁸⁾

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zusätzliche Anhaltspunkte über die Beziehungen des Harnkallikreins zu den Katecholaminen und deren Abkömmlinge, sowie zum Elektrolyt-Wasserhaushalt im Zusammenhang mit der Regulation des Blutdruckes zu gewinnen.

B EXPERIMENTELLER TEIL

I. Definition der Einheiten⁵⁾

1. Die biologische Kallikreineinheit

"Eine biologische Kallikreineinheit (1 KE) ist diejenige Menge Kallikrein, die bei i. v. Injektion am Carotidruck eines narkotisierten Hundes dieselbe Senkung auslöst, wie 5 ml Harn von gesunden Menschen aus einer Sammelprobe von mindestens 50 l, die 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert worden war.⁴⁾ (Diese Einheit wird in der anglo-amerikanischen Literatur auch als 1 FU = Frey Unit bezeichnet.)"

2. Die enzymatische Kallikreineinheit

"Eine enzymatische Kallikreineinheit (1 eKE) ist diejenige Menge Kallikrein, die unter Standardbedingungen 1μ Mol N α -Benzoyl-L-argininäthylester (BAEE) pro min umsetzt."^{25) 27)}

1 eKE entspricht somit 1 IU (International Unit). Der 1000. Teil dieser Kallikreinmenge ist 1 meKE, bzw. 1 mU."

Biologische und enzymatische Kallikreineinheiten sind nicht identisch. Für verschiedene Kallikreine ergeben sich unterschiedliche Umrechnungsfakto-

ren x, die in folgender Tabelle aufgeführt sind:

Kallikrein aus:	x =
Schweinesubmandibularis	2,3
Schweinepankreas	1,0
Schweineserum	0,8
Schweineharn	2,3
Menschenharn	8,8

Umrechnung:

$$mU = x \cdot KE$$

3. Inhibitor Einheiten

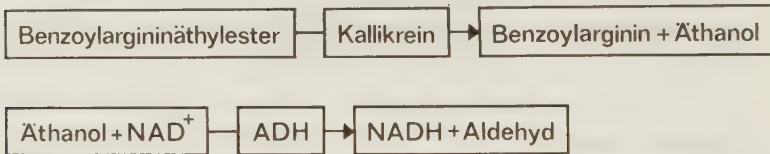
"Eine Einheit des Kallikrein-Trypsin Inhibitors (Trasylo[®]) aus Rinderorganen (1 KIE) ist diejenige Menge Inhibitor, die unter Standardbedingungen (15 min Inkubation bei pH 8,0 und 37° C) 2 KE aus Schweinepankreas zu 50 % hemmt. Es läßt sich auch eine enzymatische Inhibitor Einheit definieren als diejenige Inhibitormenge, die unter Standardbedingungen (15 min Inkubation beim pH-Optimum des Enzyms und bei Raumtemperatur) die Aktivität von 2 eKE zu 50 % hemmt, bzw. den Substratumsatz bei Standardbedingungen um 1 µMol/min reduziert. Der 1000. Teil dieser Inhibitormenge ist eine Inhibitor-milli-Einheit (1 mIE)."

II. Bestimmungsmethoden

1. Die spektrophotometrische Bestimmung des Harnkallikreins

(nach I. Trautschold und E. Werle²⁶⁾)

Bei dieser Methode wird die Spaltungs-Geschwindigkeit von N^α-Benzoyl-L-argininäthylester (BAEE) nach folgenden Reaktionsgleichungen gemessen:



Reagenzien

1. Nikotin-amid-adenin-dinukleotid (NAD^+)
(Boehringer Mannheim)
In je 1 ml H_2O bidest. 20 mg NAD^+ lösen.
(2 Tage haltbar)
2. N^α -Benzoyl-L-arginin-äthylester (BAEE)
(Merck)
In je 1 ml H_2O bidest. 1 mg BAEE lösen.
(1 Tag haltbar)
3. Alkoholdehydrogenase (ADH, Kristallsuspension)
1 Ampulle zu 3,4 ml enthält 100 mg ADH.
(Boehringer Mannheim)
4. Trasylol[®] Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen
1 Ampulle enthält 100 000 KIE/10 ml
(Bayer)
5. Pyrophosphatpuffer pH 8,7

Herstellung:

15,2 g Natriumpyrophosphat

4,1 g Semicarbacid

0,9 g Glycin in 500 ml H_2O bidest. lösen

und mit 2n NaOH auf pH 8,7 einstellen.

(14 Tage haltbar)

a) Die spektrophotometrische Bestimmung
des Harnkallikreins bei Ratten

Rattenharn aus einer 24 h Sammelprobe wird im Verhältnis 1 : 3 verdünnt.
Hiervon werden 2 ml in einem Cellophan-Dialysierbeutel (Hersteller Kalle AG)
8 - 12 h in mindestens 1 l H₂O dest. unter ständigem Rühren dialysiert. An-
schließend wird das Volumen nach der Dialyse bestimmt und klarzentrifugiert.

Ausführung:

1 ml Dialysat wird mit 0,01 ml Trasylol[®]
versetzt und gut vermischt.

In je zwei Küvetten, Schichtdicke 1 cm
werden pipettiert:

0,02 ml ADH

2,4 ml Pyrophosphatpuffer

0,5 ml BAEE Lösung

0,1 ml NAD⁺ Lösung

Jeder dieser beiden Ansätze wird gut
vermischt und 5 min bei 25^o C inkubiert.

Anschließend wird in Küvette I:

0,02 ml Dialysat + Trasylol

und in Küvette II:

0,02 ml Dialysat

pipettiert und gut vermischt.

Das Endvolumen in jeder Küvette beträgt nun: 3,04 ml.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2 min wird die Extinktionsänderung der beiden Küvetten während 10 min bei einer Wellenlänge von Hg 366 nm und 25° C bestimmt.

Es werden so zwei Werte abgelesen:

1. $\Delta EO/10 \text{ min} = \text{Leerwert}$,
da hier die Kallikreinaktivität durch
Trasylo[®] gehemmt wurde.
2. $\Delta EM/10 \text{ min} = \text{Meßwert}$,
da hier die Kallikreinaktivität nicht
gehemmt wurde.

Berechnung:

Die Größe der Differenz aus dem Meßwert ΔEM und dem Leerwert ΔEO ist von der Kallikreinkonzentration im Harn abhängig. Der Wert für ΔEO muß jedoch noch korrigiert werden, da pro ml Dialysat 0,01 ml Trasylo[®] zugesetzt wurden. Dies entspricht einer Verdünnung von 1 %. Daher muß der Wert ΔEO mit 0,01 multipliziert werden.

Die weitere Berechnung erfolgt unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ , der der Extinktion (bei der entsprechenden Wellenlänge, pro cm Schichtlänge) entspricht, die eine 1 molare Lösung des Produktes (hier NADH) besitzt.

Die folgende Formel dient als Berechnungsunterlage:²⁾

$$\text{Aktivität} \triangleq \Delta E / \text{min} \cdot \frac{10^6 \cdot EV}{\epsilon \cdot d \cdot AV} \left[\frac{\text{mU}}{\text{ml}} \right]$$

Es ist:

$$\begin{aligned} \Delta E / \text{min} &: \frac{\Delta EM - (\Delta EO \cdot 1,01)}{10} \\ EV \text{ das Endvolumen} &: 3,04 \text{ [ml]} \\ AV \text{ das Analysenvolumen} &: 0,02 \text{ [ml]} \\ d \text{ die Schichtlänge der Küvetten} &: 1,0 \text{ [cm]} \\ \epsilon \text{ für NADH bei Hg 366 nm} &: 3,30 \cdot 10^3 \text{ [l Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}] \end{aligned}$$

Diese Größen eingesetzt in die Formel ergibt sich:

$$\begin{aligned} \text{Aktivität} \\ \text{im Dialysat} \\ \text{bei Hg 366 nm} \end{aligned} = \frac{\Delta EM - (\Delta EO \cdot 1,01)}{10} \cdot \frac{10^6 \cdot 3,04}{3,30 \cdot 10^3 \cdot 1,0 \cdot 0,02}$$

Zusätzlich muß berücksichtigt werden, daß sich aus osmotischen Gründen das Volumen im Dialysierbeutel während der Dialyse ändert.

$$\begin{aligned} \text{Aktivität} \\ \text{im Harn} \\ \text{bei Hg 366 nm} \end{aligned} = \frac{\Delta EM - (\Delta EO \cdot 1,01)}{10} \cdot 46\,060,6 \cdot \frac{V. n. D.}{V. v. D.} \left[\frac{\text{mU}}{\text{ml}} \right]$$

V.n.D.: Volumen nach Dialyse

V.v.D.: Volumen vor Dialyse

b) Die spektrophotometrische Bestimmung
des Harnkallikreins beim Menschen

Da im menschlichen Harn die Kallikreinkonzentration erheblich niedriger ist als im Harn von Ratten, wird die Methode von I. Trautschold und E. Werle in modifizierter Form angewendet.¹¹⁾

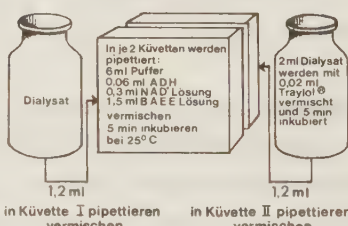
Die Reagenzien bleiben unverändert, jedoch werden die Harnproben nicht verdünnt. Um die Empfindlichkeit der Methode zu erhöhen, werden 4 cm Küvetten verwendet, da hier der Unterschied zwischen Leerwert und Meßwert viermal so groß ist. Das größere Küvettenvolumen bedingt ein größeres Endvolumen von 9,06 ml, sowie ein größeres Analysenvolumen von 1,2 ml. Es werden konstant 10 ml Harn dialysiert.

Diese Veränderungen müssen bei der Berechnung der Meßergebnisse berücksichtigt werden.

Die Methode kann als spezifisch für die Bestimmung des Harnkallikreins angesehen werden, mit Ausnahme bei Patienten mit Pankreascarcinomen sowie nach Pankreasoperationen, bei denen geringe Mengen Trypsin im Harn nachgewiesen werden konnten,²¹⁾ welches ebenfalls durch Trasylol[®] gehemmt werden kann.

In diesem Fall kann die Kallikreinaktivität abgegrenzt werden gegenüber der Trypsinaktivität, indem Vergleichsmessungen durchgeführt werden, bei denen zum Dialysat zusätzlich zu Trasylol[®] SBI (Samenblaseninhibitor) zugesetzt wird, welcher zwar Trypsin jedoch nicht Harnkallikrein hemmt.

Das nachfolgende Schaubild kann als Arbeitsanleitung dienen.¹¹⁾

Spektrophotometrische Bestimmung des Harnkallikreins beim Menschen	
REAGENZIEN	MESSVORBEREITUNG
ADH Alkoholdehydrogenase Kristallsuspension (Boehringer, Mannheim) BAEE N^{α} Benzoyl-argininäthyl- ester - hydrochlorid (Merck) 1mg/ml H_2O bidest. 1 Tag haltbar NAD^+ Nicotinamid - adenin - dinucleotid (freie Säure) (Boehringer, Mannheim) 20mg/ml H_2O bidest. 2 Tage haltbar TRASYL[®] Kallikrein - Inhibitor (Bayer) 100 000 KIE/10ml Ampulle PYROPHOSPHATPUFFER Herstellung: 15,2 g Natrium - Pyrophosphat (Merck) 4,1 g Semicarbacid (Merck) 0,9g Glycin (Merck) in 500 ml H_2O bidest. lösen mit konz. NaOH auf pH 8,7 einstellen 14 Tage haltbar	Dialysieren: 10 ml Harn werden in einem Cellophan-Dialysierschlauch (Kalle AG, Trockenflächbreite ca. 25mm, Länge konstant 15cm) 8-12 h in min = destens 1l H_2O dest. unter Rühren dialysiert. Anschließend Volumen nach Dialyse = Vol.n.D. im Meßzylinder bestimmen. Klarzentrifugieren bei 5 000 - 7 000 U/min. MESSVORGANG: bei Hg 366 nm und 25°C Schichtlänge der Küvetten: 4 cm  In je 2 Küvetten werden pipettiert: 6ml Puffer 0,06 ml ADH 0,3 ml NAD^+ Lösung 1,5 ml BAEE Lösung vermischen 5 min inkubieren bei 25°C 2ml Dialysat werden mit 0,02 ml Trasyl[®] vermischt und 5 min inkubiert 1,2 ml in Küvette I pipettieren vermischen 1,2 ml in Küvette II pipettieren vermischen nach weiteren 2 min Inkubationszeit Extinktion bei t = 0 min Extinktion bei t = 0 min " " t = 10 min " " t = 10 min ablesen und aus den erhaltenen Werten ΔEM (Meßwert) und ΔEO (Leerwert) nach der Beziehung: $[\text{Et}10 - \text{Et}0]$ errechnen BERECHNUNG: $[\Delta \text{EM} - (\Delta \text{EO} \cdot 1,01)] \cdot 5,72 \cdot \text{Vol.n.D} \triangleq \left[\frac{\text{mU}}{\text{ml}} \right]$

2. Die biologische Bestimmung des Harnkallikreins⁵⁾

"Bei der biologischen Methode dient als Maß die Änderung des Blutdruckes im großen Kreislauf nach i. v. Injektion der Probelösungen. Die Bestimmung wird am besten beim künstlich beatmeten, atropinisierten Hund in Pernocton- oder Barbital-Narkose ausgeführt. Der Carotisdruck wird fortlaufend registriert. Die Wirkung der injizierten Probe wird mit einer Standardlösung verglichen, die aus Menschen- oder Schweineharn gewonnen und so eingestellt wird, daß der Kallikreingehalt 1 KE/ml (entsprechend der Definition der Kallikreineinheit) entspricht. Als Versuchstier wurde der Hund gewählt, weil er gut auf Kallikrein anspricht, dagegen auf Renin und Histamin schwächer als andere Säuger, wie Katze und Meerschweinchen. Das Verfahren eignet sich gut zur Harn- und Plasmakallikreinbestimmung, da die Versuchstiere bei Injektion kleiner Kallikreinmengen (0,01 - 0,03 KE/Kg) und bei genügenden Pausen zwischen den Injektionen (3 - 5 min) während mehreren Stunden gleichmäßig reagieren. Die untere Grenze der Ansprechbarkeit liegt bei 0,005 - 0,002 KE je Kg Tier."

3. Die Bestimmung der Vanillinmandelsäure im Harn ³³⁾

Die im folgenden zur Bestimmung der Vanillinmandelsäure (4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure) beschriebene Methode entspricht im wesentlichen der Methode von J. J. Pisano und Mitarbeitern.²⁰⁾

Die Vanillinmandelsäure (VMA) wird durch Ausschütteln des angesäuerten Harnes mit Äthylacetat abgetrennt. Durch Natrium-meta-perjodat wird sie zu Vanillin oxydiert. Die Extinktion des isolierten Vanillins kann bei 360 nm gemessen werden. Aus der Extinktion wird auf die Konzentration im Harn geschlossen.

Reagenzien:

1. Natrium-meta-perjodat (NaJO_4)
2 %ige H_2O dest. Lösung
(1 Woche haltbar bei 25° C)
2. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$
10 %ige H_2O dest. Lösung
(1 Woche haltbar bei 3° C)
3. 1M K_2CO_3 -Lösung
4. 5n Essigsäure
5. 2n KH_2PO_4 -Lösung pH 7,5

Herstellung:

2n KH_2PO_4 wird mit 850 ml H_2O dest. gelöst und mit 7n NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Anschließend wird die Lösung mit H_2O dest. auf ein Gesamtvolumen von 1 l aufgefüllt.

6. Äthylacetat
7. Toluol
8. NaCl
9. Vanillinmandelsäure puriss.
(Fluka)

Durchführung

5 ml Harn aus einer 24 h Sammelprobe werden in einem 50 ml, unten spitz ausgezogenen Zentrifugenglas mit 0,5 ml 6n HCl angesäuert. Nach Zugabe von 1 g NaCl wird die Probe mit 30 ml Äthylacetat 5 min geschüttelt. Anschließend wird 5 min bei ca. 2000 U/min zentrifugiert. Es bilden sich im Zentrifugenglas zwei Phasen, deren untere mit einer Rekordspritze abgesaugt wird. Um die letzten Reste der Unterphase entfernen zu können, muß noch einmal 1 min zentrifugiert werden. Das Äthylacetat wird im Reagenzglas belassen und mit 3,0 ml K_2CO_3 -Lösung geschüttelt und abzentrifugiert. Jetzt wird das Acetylacetat abgesaugt. Aus der im Zentrifugenglas verbliebenen K_2CO_3 -Lösung wird je 1 ml in zwei weitere gleichartige Zentrifugengläser pipettiert und einer der beiden Proben 0,2 ml 2 %ige NaJO_4 -Lösung zugesetzt (Meßwert) und 30 min bei 50° C inkubiert. Die zweite Probe wird ebenso behandelt, jedoch wird kein Oxydationsmittel zugesetzt (Leerwert). Nach Abkühlen der Proben werden diese

mit 0,2 ml 10 %iger $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -Lösung versetzt. Zum Leerwert wird jetzt zusätzlich noch 0,2 ml 2 %ige NaJO_4 -Lösung gegeben. Diese Reihenfolge, zuerst Reduktionsmittel und dann Oxydationsmittel muß eingehalten werden. In beide Probengefäße wird nun 0,6 ml 2n Phosphatpuffer (pH 7,5) pipettiert. Anschließend werden beide Proben mit 30 ml Toluol ausgeschüttelt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren wird die wäßrige Phase abgesaugt. Aus Gründen der Genauigkeit wird nochmal mit 2,0 ml Puffer gewaschen und erneut eine Phasentrennung durchgeführt. Die Unterphase wird verworfen. Durch diese Wiederholung werden die Reste der wäßrigen Phase vollständig entfernt. Nun wird das Toluol mit 2,0 ml 1M K_2CO_3 -Lösung ausgeschüttelt und erneut zentrifugiert und die Oberphase abgesaugt. Die Extinktion der Unterphase, einer K_2CO_3 -Lösung, wird bei 360 nm mittels eines UV-Spektrometers (Zeiss PMQ II) gegen 1M K_2CO_3 gemessen.

Meßbedingungen am Spektralphotometer

(Zeiss PMQ II)

Verstärkung: 10/I/I

Bandbreite: 0,4 - 0,5 nm

Falschlicht-Schutzfilter: 320 - 380 nm

Bei den Messungen werden mehrere Standardlösungen mitgeführt:

z. B.

2 mg VMA gelöst in 100 ml 0,01n HCl

20 mg " " " " " "

40 mg " " " " " "

u.s.w.

Auf diese Weise kann eine Eichkurve zwischen Extinktion der Proben und der VMA-Konzentration erstellt werden. Durch Zugabe von beispielsweise 0,03 mg VMA zu einer Harnprobe von 10 ml kann die Ausbeute der Methode bestimmt werden. Dies ist zur Überprüfung der eigenen Arbeitsgenauigkeit unerlässlich.

Berechnung:

Der VMS-Gehalt einer Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$\mu\text{g VMS} = \frac{E_P - E_{PL}}{E_S - E_{SL}} \cdot \mu\text{g VMS}_S$$

E = Extinktion

S = Standard

indices:

PL = Probenleerwert

P = Probe

SL = Standardleerwert

Normalwerte für die VMA im Harn:

2 - 6 mg/24 h

4. Bestimmung von Normetanephrin und Metanephrin im Harn¹⁹⁾

Die Abbauprodukte der Katecholamine Normetanephrin und Metanephrin werden nach der von J. J. Pisano erarbeiteten Methode durchgeführt, wobei zunächst beide Metaboliten hydrolysiert und an Ionenaustauscherharz Amberlite CG - 50 I[®] adsorbiert werden. Anschließend werden sie eluiert und mittels Perjodat zu Vanillin oxydiert. Dieses kann spektrophotometrisch bestimmt werden.

Reagenzien:

1. Ionenaustauscherharz Amberlite CG 50 I[®]
pH 6,0 - 6,5
2. Natriummetaperjodat (NaJO_4)
2 %ige Lösung in H_2O dest.
(bei 3^o C 1 Monat haltbar)
3. 6n HCl
4. 10n NaOH
5. 4n NH_4OH
6. Standardlösung
D.L. -Normetanephrin-hydrochlorid
(Carl Roth Karlsruhe)

1 ml Standard soll 10 µg Normetanephrin enthalten. Der Anteil des Hydrochlorids entspricht laut Hersteller 16,21 % des Molekulargewichts des Normetanephrin-hydrochlorids. Um dieses zu berücksichtigen, werden also je 100 ml H_2O 1,162 mg Normetanephrin-hydrochlorid eingewogen.

Zur Herstellung der Standardlösung kann auch D.L.-Metanephrin-hydrochlorid verwendet werden. Soll 1 ml Standard 100 μg Metanephrin enthalten, müssen je 10 ml H_2O 1,156 mg D.L.-Metanephrin-hydrochlorid eingewogen werden, da der Anteil des Hydrochlorids hier 15,6 % des Molekulargewichts des D.L.-Metanephrin-hydrochlorids beträgt.

Reinigung des Ionenaustauscherharzes

Das Ionenaustauscherharz Amberlite CG 50 I ^(R) mit der nominellen Siebzahl von 100 - 200 mesh muß auch vor dem erstmaligen Gebrauch gereinigt werden. Es wird zunächst mit der dreifachen Menge H_2O dest. versetzt und über 10 min gerührt. Nachdem sich das Harz über 30 min abgesetzt hat, wird die überstehende Flüssigkeit dekantiert. Dieser Prozeß wird ungefähr 5 mal wiederholt, dann sollte die überstehende Flüssigkeit schon nach 15 min klar sein. Vor Benutzung des Harzes wird es in die Na^+ -Form übergeführt. Dies geschieht wie folgt:

1 Teil Harz wird mit 3 Teilen H_2O versetzt, dann werden 2 Teile 10n NaOH innerhalb von 15 min hinzugefügt und das Harz 2 Stunden gerührt. Nach Absetzen des Harzes über 15 min, wird die überstehende Flüssigkeit dekantiert. Dieser Waschprozeß wird sooft wiederholt, bis das Wasser fast neutral ist. Das Harz wird weiter gereinigt, indem es wieder in die Säureform übergeführt wird. 1 Teil Harz wird mit 5 Teilen 6n HCl versetzt und 30 min gerührt. Nachdem sich das Harz abgesetzt hat, wird die überschüssige Flüssigkeit dekantiert. Die restliche Säure wird mit H_2O dest. ausgewaschen. Danach wird das Harz wieder in die Na^+ -Form übergeführt (siehe oben).

Die gewaschene Na^+ -Form des Harzes wird mit dem gleichen Volumen H_2O dest. suspendiert und gerührt. Es wird solange Eisessig zugesetzt, bis der pH-Wert 6,0 - 6,5 beträgt.

Das Harz ist dann zum Gebrauch fertig, wenn der pH-Wert länger als eine halbe Stunde unter Rühren konstant bleibt. Benutztes Harz wird regeneriert, indem es zunächst in die Säureform übergeführt wird und anschließend wieder in die Na^+ -Form gebracht wird.

Durchführung:

Der Harn wird unter Zusatz von 5 ml 37 % HCl über 24 Stunden gesammelt. 10 ml werden mit 6n HCl auf pH 0,7 eingestellt und 20 min in einem geschlossenen Reagenzglas in kochendem Wasserbad hydrolysiert. Nach Abkühlen der Probe wird mit 1n NaOH auf einen pH von 6,0 - 6,5 eingestellt und auf 20 ml aufgefüllt.

Eine Säule mit dem Durchmesser von etwa 1 cm und etwa 12 cm Höhe wird nach unten mit Glaswolle verschlossen und mit einer 5 cm hohen Schicht Amberlite CG 50 I [®] aufgefüllt. Zunächst wird mit 15 ml H₂O gewaschen, um die Pufferlösung, die bei der Regeneration verwendet wird, aus dem Harz auszuwaschen. Anschließend wird die hydrolysierte Probe über die Säule mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min gegeben. Nun wird mit 15 - 20 ml Wasser nachgespült. Anschließend werden die Metanephrene mit 10 ml 4n NH₄OH eluiert. Von den 10 ml Säuleneluat werden 2 Proben mit je 4 ml entnommen. Zu der einen Probe werden 0,1 ml Perjodat-Lösung zugesetzt und geschüttelt (Meßwert), zur anderen Probe 0,1 ml H₂O an Stelle der Perjodat-Lösung (Leerwert).

Die Extinktionen dieser Lösungen werden gegenüber einem Reagenzienleerwert gemessen, bei dem 4 ml 4n NH₄OH mit 0,1 ml Perjodat-Lösung versetzt wurden, da Perjodat eine leichte Extinktion bei 360 nm zeigt. Außerdem wird bei 333 nm und 350 nm gemessen. Dies hat seine Ursache darin, daß gelegentlich unbekannte Metaboliten im Harn auftreten, die bei 350 nm mitbestimmt werden. Sie zeigen eine starke Extinktion bei 333 nm. Auf diese Weise kann

ihr Vorhandensein festgestellt werden. Es muß dann zur Berechnung der Ergebnisse die Extinktion bei 360 nm verwendet werden, weil bei dieser Wellenlänge die störenden Metaboliten nicht mehr miterfaßt werden. Stimmt das Verhältnis der Meßergebnisse der Standardlösung bei 350 nm und 360 nm mit dem Verhältnis der Probenmessungen überein, werden die Extinktionen bei 350 nm verwendet.

Die Ausbeute der Methode muß ständig überprüft werden, indem zu einer Harnprobe eine physiologisch vorkommende Menge Metanephrene zugesetzt und untersucht wird wieviel Prozent bei der Messung wiedergefunden werden.

Die Ausbeute soll bei Zusatz von 27 - 45 µg Normetanephrin 83 - 104 % sein.

Die Berechnung des Metanephriingehaltes der Probe erfolgt nach der Beziehung:

$$\mu\text{g METANEPHRIN} = \frac{E_P - E_{PL}}{E_S - E_{SL}} \cdot \mu\text{g (NOR)META-NEPHRIN}_S$$

Erklärung der Symbole siehe Bestimmung der VMA.

Normalwerte für Metanephrene im Harn:

0,06 - 1,38 mg/24 Stunden

5. Die Bestimmung der Harnelektrolyte

Natrium, Kalium, Calcium

Die Harnelektrolyte Na^+ , K^+ und Ca^{++} werden flammenphotometrisch bestimmt.³⁵⁾

III. Klinische Untersuchungen beim Menschen und

Erläuterung zur statistischen Überprüfung der Ergebnisse

Bei Patienten mit Hypertonien unklarer Genese, bei denen ein Verdacht auf ein Phaeochromozytom besteht, wird die Ausscheidung von Vanillinmandelsäure und Metanephrinen (Metanephrin + Normetanephrin) im 24 Stunden Harn bestimmt. Bei diesen Harnen wird gleichzeitig die tägliche Kallikreinausscheidung gemessen. Zusätzlich sollen die Harnelektrolyte Na^+ , K^+ , Ca^{++} bestimmt werden.

Um festzustellen, ob eine Beziehung der Katecholamine und der Harnelektrolyte zur täglichen Kallikreinausscheidung besteht, wird die Korrelation durch Errechnung des Bravais-Pearsonschen Korrelationskoeffizienten r überprüft. Dieser wird nach folgender Formel errechnet:²²⁾

$$r = \frac{\sum xy - n \bar{x} \bar{y}}{\sqrt{(\sum x^2 - n \bar{x}^2)(\sum y^2 - n \bar{y}^2)}}$$

$x \triangleq$ einem Ergebnis der 1. Untersuchungsreihe

$y \triangleq$ einem Ergebnis der 2. Untersuchungsreihe

$\bar{x} \triangleq$ dem arithmetischen Mittel aller Ergebnisse der 1. Untersuchungsreihe

$\bar{y} \triangleq$ dem arithmetischen Mittel aller Ergebnisse der 2. Untersuchungsreihe

$n \triangleq$ Anzahl der untersuchten Harnproben

Aus den Ergebnissen für r kann nach tabellarischer Auswertung³⁴⁾ eine Aussage über die Korrelation zwischen beiden Meßreihen gemacht werden.

Die Korrelation kann auch in einem Streudiagramm dargestellt werden, dessen Regressionsgerade durch die lineare Regressionsfunktion gegeben ist.²⁴⁾

$$y' = A + Bx$$

Für die Koeffizienten A und B gilt:

$$A = \bar{y} - B \bar{x}$$

$$B = \frac{\sum xy - n \bar{x} \bar{y}}{\sum x^2 - n \bar{x}^2}$$

Für jedes Meßergebnis x aus den n untersuchten Harnproben, kann der entsprechende Wert y' errechnet werden, der auf der Regressionsgeraden liegt. Durch Berechnung zweier y' -Werte ist die Regressionsgerade darstellbar.

IV. Tierversuche

1. bei Ratten

Bei den im folgenden beschriebenen Versuchen werden durchwegs weibliche Albino-Ratten verwendet.

a) Versuch mit Reserpin

Das Antisymphotonikum Reserpin gilt als Prototyp der Pharmaka, welche die Speicherfähigkeit der sympathischen Granula für Katecholamine herabsetzen. Bei einschleichender Dosierung kommt es zu einer Blutdrucksenkung auf Grund der Verarmung an biogenen Aminen. Dieser Effekt wird therapeutisch zur Behandlung der Hypertonie ausgenutzt.^{9) 13)}

Hier soll Reserpin parenteral verabreicht werden, um zu untersuchen, ob durch eine Katecholaminverarmung im Organismus eine Veränderung der täglichen Harnkallikreinausscheidung erfolgt.

Verwendetes Präparat:

Sedaraupin[®] Ampullen 1 mg/ml

b) Versuch mit α -Methyl-dopa

Die Überträgersubstanzen Noradrenalin und Adrenalin werden aus Dopa (Dihydroxyphenylalanin) über die Zwischenstufe Dopamin gebildet. Wird der Organismus mit physiologisch nicht vorkommendem α -Methyl-dopa überschwemmt, wird vorwiegend α -Methyl-noradrenalin und α -Methyl-adrenalin gebildet. Sie werden wie Noradrenalin und Adrenalin in den sympathischen Granula gespeichert und auf Reiz freigegeben. Ihre adrenerge Wirksamkeit beträgt nur ein Bruchteil derjenigen von Adrenalin und Noradrenalin. Es kann so eine Blutdrucksenkung herbeigeführt werden.^{9) 13)}

Die parenterale Verabreichung von α -Methyl-dopa soll Aufschluß darüber geben, ob durch diese Veränderung des Blutdruckes die tägliche Harnkallikreinausscheidung beeinflusst wird.

Verwendetes Präparat:

Aldometil [®] Tabletten zu je 250 mg

Die Tabletten werden von ihrem Schutzlack befreit und in physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert.

c) Versuch mit kochsalzreicher Ernährung

Bei diesem Versuch soll durch erhöhte Kochsalzzufuhr, indem 2 %ige NaCl-Lösung den Tieren als Trinkflüssigkeit zugeführt wird, untersucht werden, ob bei kochsalzreicher Ernährung eine Veränderung der täglichen Kallikreinausscheidung zu beobachten ist.

d) Erläuterung zur statistischen Überprüfung der Ergebnisse bei Ratten²²⁾

Um zu dokumentieren, daß die Veränderung der täglichen Harnkallikreinausscheidung nicht auf Zufällen beruht, sondern durch die Behandlung mit den einzelnen Pharmaka verursacht wird, werden die Meßergebnisse bei den behandelten Tieren mit denen von Kontrolltieren statistisch verglichen. Hierzu geeignet erscheint der Student t-Test. Er erlaubt die Berechnung einer Testgröße T, die nach anschließender tabellarischer Auswertung³⁴⁾ eine Bewertung der prozentualen Irrtumswahrscheinlichkeit für die Folgerung der Abhängigkeit der Änderung der täglichen Harnkallikreinausscheidung von der pharmakologischen Wirkung ermöglicht.

Die Testgröße T errechnet sich nach folgender Formel:

$$T = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

- $\bar{x}_1 \triangleq$ Mittelwert der täglichen
Kallikreinausscheidung der Kontrolltiere
 $\bar{x}_2 \triangleq$ " " behandelten Tiere
 $s_1 \triangleq$ Standardabweichung von $\bar{x}_1$
 $s_2 \triangleq$ " " $\bar{x}_2$
 $n_1 \triangleq$ Anzahl der Meßwerte bei den Kontrolltieren
 $n_2 \triangleq$ " " " " " behandelten Tieren

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wird dabei durch die Größe p prozentual ausgedrückt, etwa $p < 0,05$ oder $p < 0,01$.

Als statistisch ausreichend signifikant wird $p < 0,05$, besser jedoch $p < 0,01$ angesehen, was besagt, daß die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % b.z.w. unter 1 % liegt.

2. Versuche bei Hunden

Die im folgenden beschriebenen Versuche werden beim beatmeten Hund in Hexobarbitalnarkose durchgeführt, wobei der Harn nach Eröffnung des Abdomens direkt aus den Ureteren über Katheter abgeleitet wird. Beim Einlegen der Katheter darf die Ureterinnenwand nicht verletzt werden, damit der Harn nicht mit Blut versetzt wird. Die einzelnen Pharmaka werden intravenös als Dauerinfusion mit konstant gehaltener Tropfenzahl pro Zeiteinheit zugeführt.

a) Versuch mit Adrenalin und Orciprenalin

Das Sympathomimetikum Adrenalin zeichnet sich durch seine Wirkung auf α - und β -Rezeptoren aus. Es kommt somit zu einer Erregung der glatten Muskulatur, sowie zu einer Aktivierung von Herz und Stoffwechsel.^{9) 13)}

Verwendetes Präparat:

Suprarenin[®] Ampullen 1 mg/ml

In dieser Zubereitung liegt Adrenalin in racemischer Form vor. Es ist also nur die Hälfte pharmakologisch wirksam.

Orciprenalin ist ein dem Isoproterenol isomeres Sympathomimetikum mit ausgeprägter Wirkung auf die β -Rezeptoren. Es kommt zu einer Erniedrigung des peripheren Widerstandes durch Orciprenalin, jedoch nicht zu einem Absinken des Blutdruckes, da Orciprenalin eine starke positiv inotrope und chronotrope Wirkung auf das Herz hat.^{9) 13)}

Verwendetes Präparat:

Alupent[®] Ampullen 5 mg/10 ml

Die Versuche mit Adrenalin und Orciprenalin haben zum Ziel zu überprüfen, ob eine Erhöhung des Blutdruckes, bzw. eine Steigerung der Herzfähigkeit eine Veränderung der Harnkalikreinausscheidung zur Folge hat.

b) Versuche mit Angiotensin II

Angiotensin II ist ein Octapeptid, welches in hoher Dosierung durch Konstriktion der Arteriolen einen Anstieg des systolischen, sowie des diastolischen Blutdruckes bewirkt. Angiotensin II ist als stärkster Vasokonstriktor bekannt. Es ist 40-mal wirksamer als Noradrenalin.⁹⁾ Angiotensin II entsteht aus dem Tetradecapeptid Angiotensinogen,²³⁾ einem α_2 -Globulin, welches in der Leber synthetisiert wird. Angiotensinogen wird durch den Einfluß von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere in Angiotensin I, einem Decapeptid umgewandelt. Ein vor allem in der Lunge lokalisiertes Enzym (converting enzyme) spaltet zwei C-terminale Aminosäuren von inaktivem Angiotensin I ab und es entsteht das aktive Octapeptid Angiotensin II. Im Organismus wird Angiotensin II durch Aminopeptidasen (Angiotensinasen) schnell abgebaut. Die Halbwertszeit beträgt beim Menschen ein bis zwei Minuten.⁷⁾

Wegen der starken Beeinflussung des Blutdruckes erscheint Angiotensin II in Dauerinfusion verabreicht geeignet, um Anhaltspunkte über die Beziehungen zwischen Blutdruck und Harnkalikreinausscheidung zu erhalten. Angiotensin II fördert ferner die Sekretion von Aldosteron.⁹⁾ Auch aus diesem Grunde scheinen Versuche mit Angiotensin II sinnvoll, da von Margolius et al.¹⁶⁾ eine Beziehung zwischen Harnkalikreinausscheidung und Hyperaldosteronismus gefunden wurde.

Verwendetes Präparat:

Hypertensin-CIBA [®] Ampullen zu 0,5 mg Trockensubstanz

c) Versuche mit Aldosteron^{9) 13)}

Das Mineralokorticoide Aldosteron der Nebennierenrinde, dessen Sekretion weitgehend unabhängig von ACTH ist, beeinflusst den Natrium-Kalium- und Wasserhaushalt in nahezu sämtlichen Geweben. In erster Linie fördert es jedoch die Rückresorption von Na^+ und H^+ im distalen Nierentubulus. Ein wichtiger Stimulator der Aldosteronsekretion ist Angiotensin II. Aldosteron steigert die Erregbarkeit der Gefäße. Ein Hyperaldosteronismus führt zu Hypokaliämie und Alkalose. Die Hyponatriämie bedingt eine Retention von Wasser und so eine gewisse Hypervolämie.^{7) 23)} Letzteres sowie die engen Beziehungen zum Angiotensin-Renin-System lassen die Vermutung zu, daß Aldosteron-Infusionen einen Einfluß auf die Kallikreinausscheidung haben könnten. Durch Aldosteroninfusionen beim Hund soll diese Möglichkeit untersucht werden.

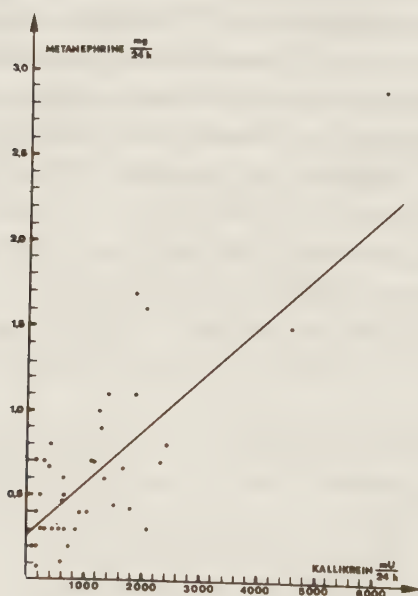
Verwendetes Präparat:

Aldocorten[®] Ampullen zu 0,5 mg/ml

C ERGEBNISSE

I. Ergebnisse der Untersuchungen beim Menschen

1. Harnkallikrein- und Metanephринаusscheidung



Die statistische Auswertung des Vergleichs zwischen täglicher Kallikrein- und Metanephринаusscheidung im Harn führte bei $n = 35$ Probenpaaren zu folgendem Ergebnis:

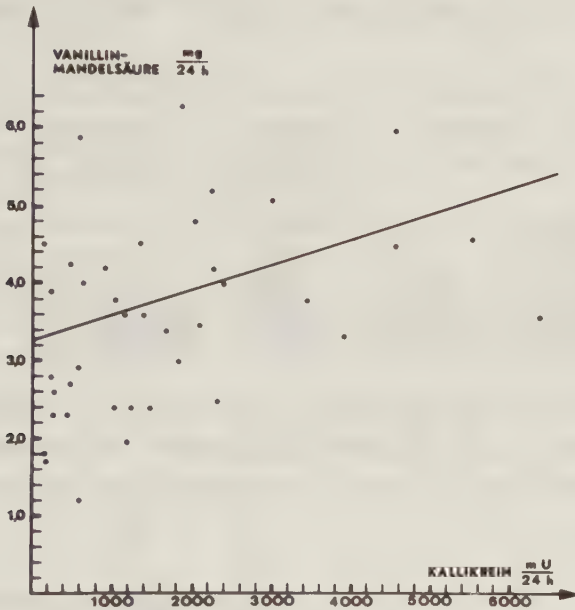
Freiheitsgrade ($n-2$) : 33

geforderter Korrelationskoeffizient r für $p = 0,01$: 0,418

gefundener Korrelationskoeffizient r : 0,779

Hiermit konnte eine Beziehung zwischen täglicher Kallikrein- und Metanephринаusscheidung im Harn nachgewiesen werden, da $p < 0,01$.

2. Harnkallikrein und Vanillinmandelsäureausscheidung



Die statistische Auswertung des Vergleichs zwischen täglicher Kallikrein- und Vanillinmandelsäureausscheidung im Harn führte bei $n = 40$ Probenpaaren zu folgendem Ergebnis:

Freiheitsgrade ($n-2$) : 38

geforderter Korrelationskoeffizient r für $p = 0,05$: 0,304

gefundener Korrelationskoeffizient r : 0,310

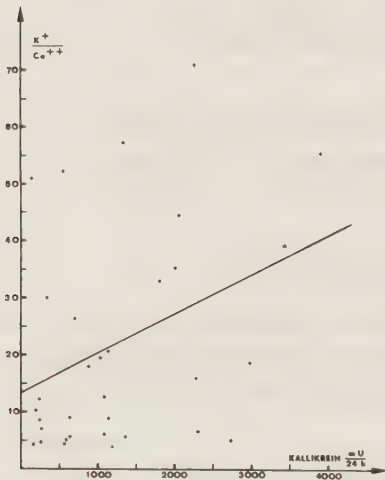
Hiermit konnte eine Beziehung zwischen täglicher Kallikrein- und Vanillinmandelsäureausscheidung im Harn nachgewiesen werden, da $p < 0,05$.

3. Harnkallikrein und Elektrolyte, Natrium, Kalium und Calcium

Die statistische Auswertung des Vergleichs zwischen täglicher Harnkallikreinausscheidung und den Harn Elektrolyten Na^+ , K^+ und Ca^{++} führte zu folgenden Ergebnissen:

Elektrolyt	Freiheitsgrade (n-2)	geforderter Korrelationskoeffizient r für $p = 0,05$	erhaltener Korrelationskoeffizient r
Na^+	49	0,273	-0,021
K^+	30	0,349	0,240
Ca^{++}	30	0,349	-0,049

Aus dem Vergleich zwischen den erhaltenen und den geforderten Korrelationskoeffizienten r für $p = 0,05$ ist ersichtlich, daß die tägliche Kallikreinausscheidung mit der täglichen Na^+ , K^+ und Ca^{++} -Ausscheidung im Harn nicht korreliert ist.



Eine Korrelation $p < 0,05$ ergab sich jedoch beim Vergleich zwischen dem Quotienten aus täglicher K^+ - und Ca^{++} -Ausscheidung $\frac{\text{K}^+}{\text{Ca}^{++}}$ und täglicher Kallikreinausscheidung im Harn.

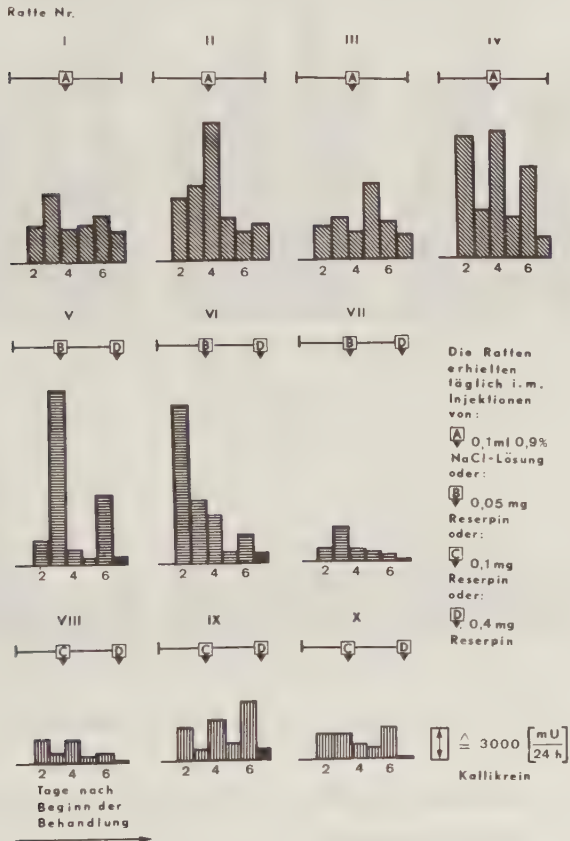
(n - 2): 30

geforderter Wert
für r, wenn $p = 0,05$: 0,349

errechneter Wert
für r: 0,367

II. Ergebnisse der Untersuchungen bei Ratten

1. Versuch mit Reserpin



Die statistische Auswertung nach dem Student t-Test des Versuches, die tägliche Harnkallikreinausscheidung mit Reserpin zu beeinflussen, führte zu folgenden Ergebnissen:

Ratte Nr.	durchschnittliche Ausscheidung (mU/24 h)	Standard-abweichung		
Kontrolltiere behandelt mit 0,9 % NaCl-Lösung:				
I - IV	5 456,095	<u>+ 3 304,297</u>	Für 25 Freiheitsgrade (n-2) errechneter Wert für T	p<
Tiere behandelt mit 0,05 mg/Tag Reserpin:				
V-VII 2. Tag	6 544,633	<u>+ 7 975,665</u>	- 0,457	
" 3. "	8 781,033	<u>+ 7 130,193</u>	- 1,447	
" 4. "	2 484,133	<u>+ 1 828,014</u>	1,513	
" 5. "	986,566	<u>+ 223,859</u>	2,305	0,05
" 6. "	3 987,133	<u>+ 3 797,448</u>	0,717	
Tiere behandelt mit 0,1 mg/Tag Reserpin:				
VIII-X 2. Tag	2 575,066	<u>+ 619,764</u>	1,484	
" 3. Tag	1 661,133	<u>+ 732,527</u>	1,953	0,05
" 4. "	2 735,800	<u>+ 1 691,041</u>	1,387	
" 5. "	1 091,833	<u>+ 775,402</u>	2,246	0,05
" 6. "	3 505,033	<u>+ 2 517,924</u>	0,982	
Tiere behandelt mit 0,4 mg/Tag Reserpin:				
V-VII 7. "	441,466	<u>+ 479,641</u>	2,584	0,01
VII-X 7. "	478,300	<u>+ 551,481</u>	2,565	0,01

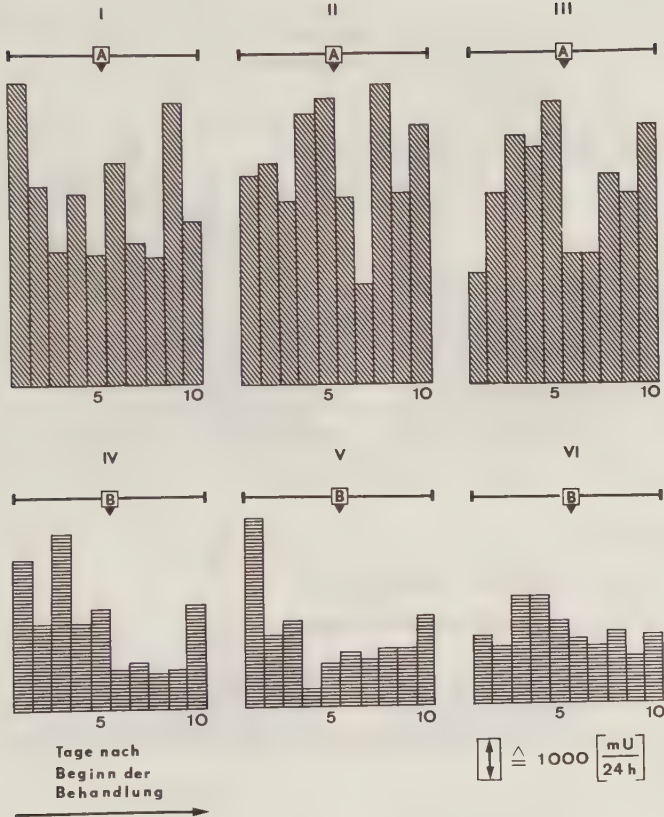
Geforderter Wert für T bei (n-2) = 25 : p < 0,05 : 1,7081

p < 0,01 : 2,485

An den Tagen, an denen p < 0,05 oder p < 0,01 ist, ist die durch Reserpinbehandlung verursachte Senkung der täglichen Harnkallikreinausscheidung als signifikant zu bezeichnen.

2. Versuch mit α -Methyl-dopa

Ratte Nr.



Die Ratten erhielten täglich intra-peritoneal:

A 0,4 ml 0,9%
NaCl-Lösung

B 0,04g
 α -Methyl-Dopa

Die statistische Auswertung nach dem Student t-Test des Versuches die tägliche Harnkallikreinausscheidung mit α -Methyl-dopa zu beeinflussen, führte zu folgenden Ergebnissen:

Ratte Nr.	durchschnittliche Aus- scheidung (mU 24 h)	Standard- abweichung			
Kontrolltiere behandelt mit 0,9 % NaCl-Lösung					
I-III	5 365,146	<u>+</u> 1 634,331	Freiheits- grade (n-2)	errech- neter Wert für T	p<
Tiere behandelt mit 0,04 g/Tag α -Methyl-dopa					
IV	2 264,692	<u>+</u> 1 261,971	10	5,470	0,0005
V	1 977,470	<u>+</u> 1 229,657	10	6,000	"
VI	2 007,970	<u>+</u> 550,698	10	6,336	"
IV-VI	2 083,377	<u>+</u> 1 036,680	30	9,334	"

Geforderter Wert:

für T bei (n-2) = 10 wenn p = 0,0005 : 4,587

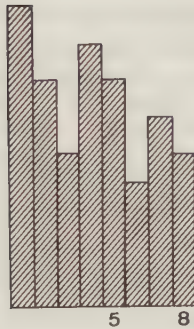
für T bei (n-2) = 30 wenn p = 0,0005 : 3,646

Die nach α -Methyl-dopa-Behandlung an allen Tagen auftretende Senkung der täglichen Harnkallikreinausscheidung ist als signifikant zu bezeichnen, da $p < 0,0005$!

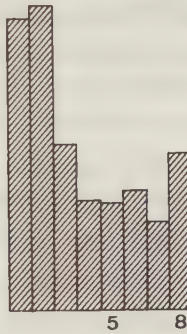
3. Versuch mit kochsalzreicher Ernährung

Ratte Nr.

I



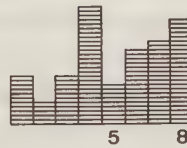
II



III



IV



Tage nach
Beginn des
Versuches



$$\updownarrow \triangleq 10 \left[\frac{\text{KE}}{24 \text{ h}} \right]$$

A Leerwerte

B Fütterung mit 2%iger NaCl-Lösung

Die statistische Auswertung nach dem Student t-Test des Versuches die tägliche Harnkallikreinausscheidung mit kochsalzreicher Ernährung zu beeinflussen, führte zu folgenden Ergebnissen:

Ratte Nr.	durchschnittliche Ausscheidung (KE/24 h)	Standardabweichung			
Kontrolltiere:					
I und II	16,064	$\pm 6,514$	Freiheitsgrade (n-2)	errechneter Wert für T	p <
Tiere gefüttert mit 2 % NaCl-Lösung					
III	6,942	$\pm 2,142$	8	3,827	0,005
IV	5,916	$\pm 2,773$	8	4,189	0,0025
III und IV	6,429	$\pm 2,451$	16	5,562	0,0005

Geforderter Wert:

für T bei (n-2) = 8 : p = 0,005 : 3,355

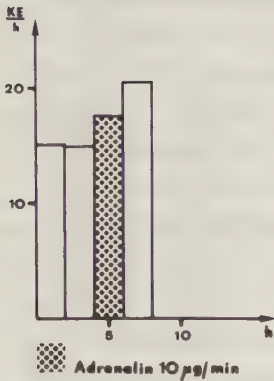
p = 0,0025 : 3,833

für T bei (n-2) = 16 : p = 0,0005 : 4,015

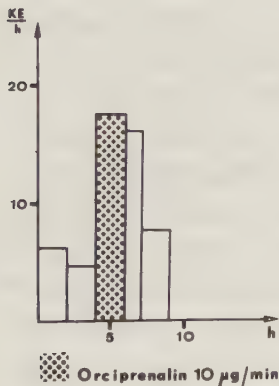
Die nach kochsalzreicher Ernährung an allen Tagen auftretende Senkung der täglichen Kallikreinausscheidung ist als signifikant zu bezeichnen, da $p < 0,005$!

III. Ergebnisse der Untersuchungen bei Hunden

1. Versuche mit Adrenalin und Orciprenalin

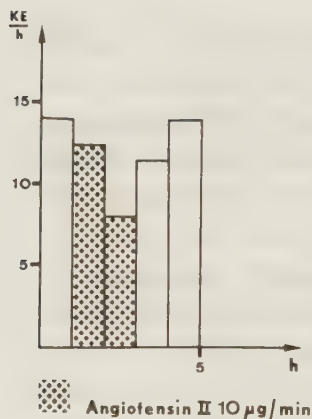


Der narkotisierte Hund zeigte vor Beginn der Adrenalininfusion von 10 µg/min eine Ausscheidung von im Mittel 14,9 KE/h. Während der Infusion über 2 Stunden stieg die Ausscheidung auf 17,5 KE/h. Dies entspricht einer Zunahme der stündlichen Kallikreinausscheidung von 17 %. Nach Absetzen der Adrenalininfusion kam es in den folgenden 2 Stunden zu einem weiteren Anstieg auf 21,0 KE/h. Die stündliche Kallikreinausscheidung stieg also bis zum Ende des Versuches um insgesamt 41 %.

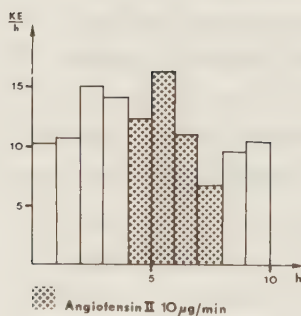


Eine deutlichere Erhöhung der stündlichen Kallikreinausscheidung wurde durch eine Orciprenalininfusion von 10 µg/min verursacht. Zu Beginn des Versuches betrug die Ausscheidung im Mittel 6,0 KE/h. Sie stieg während der Infusion über 2 Stunden auf 17,5 KE/h an. Dies bedeutet eine Erhöhung von 192 %. Nach Absetzen der Infusion konnte im Gegensatz zur Adrenalininfusion kein weiterer Anstieg beobachtet werden. Die Ausscheidung kehrte mit 8,0 KE/h innerhalb von 3 Stunden nahezu auf den Ausgangswert zurück.

2. Versuche mit Angiotensin II



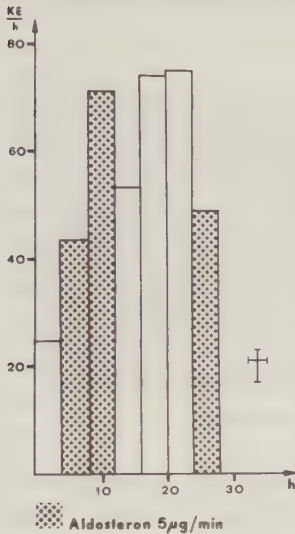
Der narkotisierte Hund zeigte vor Beginn der Angiotensin II-Infusion von 10 µg/min eine durchschnittliche Ausscheidung von 14,0 KE/h, welche nach Einsetzen der Angiotensin II-Infusion sich in der ersten Stunde auf 12,5 KE/h erniedrigte. In den nächsten Stunden sank die Ausscheidung auf 8,0 KE/h ab. Dies entspricht einer Erniedrigung der stündlichen Kallikreinausscheidung von 42 % gegenüber dem Ausgangswert. Nach Absetzen der Infusion kehrte die Kallikreinausscheidung während der nächsten 2 Stunden auf den Ausgangswert von 14,0 KE/h zurück.



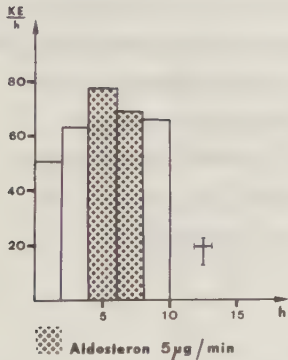
Dieser Hund schied in Narkose während der ersten 4 Stunden vor Beginn der Angiotensin II-Infusion von 10 µg/min im Mittel 12,8 KE/h aus. Während der weiteren 3 Stunden änderte sich die Kallikreinausscheidung mit 13,3 KE/h im Mittel nicht wesentlich. Erst in der vierten Stunde konnte ein Absinken auf 6,7 KE/h beobachtet werden. Dies entspricht einer Erniedrigung gegenüber dem Ausgangswert von 46 %. Nach Ab-

setzen der Infusion kehrten die Kallikreinwerte mit 10,5 KE/h auf nahezu den Ausgangswert zurück.

3. Versuche mit Aldosteron

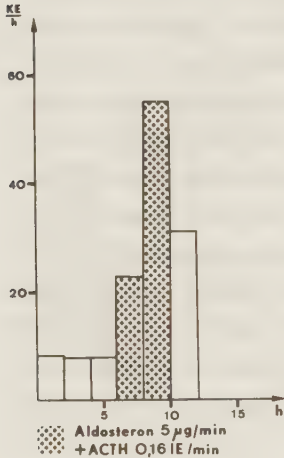


In Narkose zeigte der Hund vor Beginn der Aldosteroninfusion von 5 µg/min eine mittlere Kallikreinausscheidung von 25,0 KE/h. Innerhalb von 8 Stunden nach Beginn der Infusion stieg die Ausscheidung auf 72,0 KE/h. Dies bedeutet eine Erhöhung von 188 % gegenüber dem Ausgangswert. Nach Absetzen der Infusion stieg die stündliche Ausscheidung innerhalb der nächsten 12 Stunden nicht wesentlich auf 76,0 KE/h. Nach 24 Stunden sollte der Versuch wiederholt werden, was jedoch nicht möglich war, weil der Hund starb.

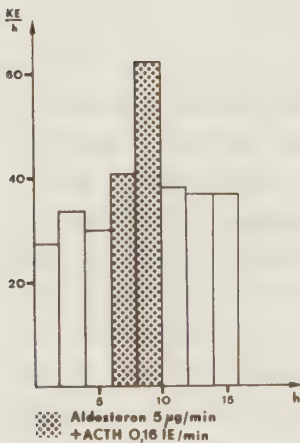


Der narkotisierte Hund wies vor Beginn der Aldosteroninfusion von 5 µg/min eine mittlere Kallikreinausscheidung von 57,4 KE/h auf. Nach Einsetzen der Infusion stieg die Kallikreinausscheidung innerhalb von 4 Stunden auf im Mittel 72,5 KE/h. Dies entspricht einem Anstieg von 26 % gegenüber dem Ausgangswert. Innerhalb der nächsten 2 Stunden erniedrigte sich die Ausscheidung geringfügig auf 66,5 KE/h. Der Versuch war nach 10 Stunden beendet, weil das Tier starb.

Eine deutliche Steigerung der stündlichen Kallikreinausscheidung konnte durch Zusatz von ACTH zur Aldosteroninfusion in den beiden folgenden Versuchen erzielt werden.



Am narkotisierten Hund betrug die Kallikreinausscheidung in den ersten 6 Stunden im Mittel 16,6 KE/h. Nach Verabreichung von 5 µg/min Aldosteron + 0,16 IE ACTH/min stieg die Ausscheidung innerhalb von 4 Stunden auf 55,0 KE/h. Dies entspricht einer Zunahme von 231 %. Nach Absetzen der Infusion sank die Ausscheidung innerhalb von 2 Stunden auf 31,2 KE/h ab.



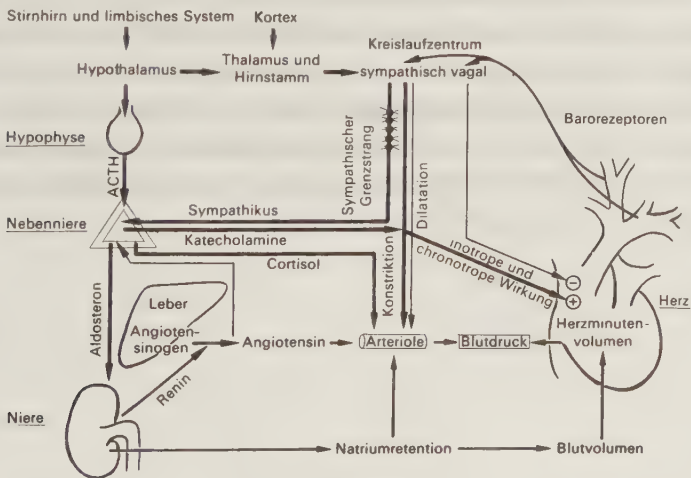
Bei diesem Versuch betrug die Kallikreinausscheidung in den ersten 6 Stunden im Mittel 30,2 KE/h. Vier Stunden nach Beginn der Infusion von 5 µg/min Aldosteron + 0,16 IE/min ACTH stieg die Ausscheidung auf 62,5 KE/h an. Dies entspricht einer Zunahme von 106 %. Nach Absetzen der Infusion normalisierte sich die Ausscheidung innerhalb von 4 Stunden mit 37,0 KE/h nahezu.

Eine Überprüfung der Ergebnisse der Versuche bei Hunden nach statistischen Gesichtspunkten war wegen der geringen Anzahl an Werten nicht möglich.

D DISKUSSION

Bei den Überlegungen über die Entstehung der verschiedenen Hypertonieformen wird denjenigen Faktoren, die zu einer Vasokonstriktion führen, besondere Bedeutung wegen der durch sie bewirkten Erhöhung des peripheren Widerstandes beigemessen. Weniger beachtet werden dagegen solche Faktoren, die eine Vasodilatation verursachen, wie dies beim Kallikrein der Fall ist, obwohl schon früher Frey, Kraut und Werle⁵⁾ und später auch Elliot und Nuzumi³⁾ darauf hinwiesen, daß bei Patienten mit essentieller Hypertonie die nicht dialysierbare, hypotensive Substanz im Harn, also Kallikrein erniedrigt ist.

Die einzelnen bekannten Faktoren, die den Blutdruck regeln, sind mit Ausnahme des Kallikrein-Kinin-Systems anschaulich in folgender Darstellung aufgezeigt.²³⁾



Schematische Darstellung der Regulation des Blutdrucks

(aus Siegenthaler Klinische Pathophysiologie)

Bei einigen in dieser Darstellung aufgeführten Blutdruckregulationsmechanismen konnte ihre Beziehung zur Harnkallikreinausscheidung überprüft werden, und zwar der Einfluß von Katecholaminen, Aldosteron, Angiotensin II, der von den Harnelektrolyten, Natrium, Kalium, Calcium und am Rande auch ACTH.

Bei den Untersuchungen wurde von der Beobachtung durch Margolius et al.¹⁶⁾ ausgegangen, daß bei Patienten mit Phäochromozytom und Hyperaldosteronismus die Harnkallikreinausscheidung signifikant erhöht ist. Wir untersuchten, ob eine Beziehung zwischen Katecholaminen und Harnkallikreinausscheidung beim Menschen auch ohne Vorliegen eines katecholaminbildenden Tumors nachweisbar ist.

Als Maß für die Katecholaminbildung im Organismus wurden ihre Abbauprodukte Metanephrine und Vanillinmandelsäure gewählt, die im Harn ausgeschieden werden und quantitativ leicht erfaßt werden können. Dabei konnte eine Korrelation zwischen täglicher Metanephrin und Kallikreinausscheidung mit $p < 0,01$ anhand von 35 untersuchten Harnproben gefunden werden. Auch zwischen der Kallikreinausscheidung und der Vanillinmandelsäureausscheidung im Harn wurde eine Korrelation bei den 40 untersuchten Harnproben gefunden, die mit $p < 0,05$ noch als signifikant zu bewerten ist. Hieraus kann gefolgert werden, daß zwischen täglicher Kallikreinausscheidung und Katecholaminumsatz ein physiologischer Zusammenhang besteht. Gestützt werden diese Befunde durch tierexperimentelle Untersuchungen.

Eine Entspeicherung der katecholaminhaltigen Strukturen mit Reserpin bei 6 Ratten führte zu einer signifikanten ($p < 0,01$) Erniedrigung der Kallikreinausscheidung gegenüber den 4 Kontrolltieren. Zur weiteren Absicherung, da Reserpin nicht nur die Katecholamine, sondern auch Serotonin entspeichert, diente der Versuch mit α -Methyl-dopa. Die Herabsetzung des wirksamen Katecholaminspiegels mittels einer falschen Überträgersubstanz führte zu einem signifikanten ($p < 0,0005$!) Absinken der täglichen Harnkallikreinausscheidung bei den 3 behandelten Ratten gegenüber den 3 Kontrolltieren.

Diese Befunde werden ferner gestützt durch Untersuchungen am narkotisierten und beatmeten Hund. Durch Adrenalininfusion von $10 \mu\text{g}/\text{min}$ über zwei Stunden konnte die Kallikreinausscheidung um 41 % gesteigert werden. Bei einem weiteren Versuch mit Orciprenalininfusion von $10 \mu\text{g}/\text{min}$ über 2 Stunden konnte eine Steigerung der stündlichen Kallikreinausscheidung um 192 % bewirkt werden. Nach Absetzen der Infusion normalisierte sich die Kallikreinausscheidung nahezu. Bei diesen beiden Versuchen ist zu beachten, daß Adrenalin eine α - und β -Wirkung aufweist, wogegen Orciprenalin ein Sympathomimetikum mit reiner β -Wirkung ist. Die Gefäßmuskulatur wird also erschlafft und der Blutdruck müßte absinken, jedoch die positiv inotrope und chronotrope Wirkung auf das Herz kompensiert diesen Effekt. Möglicherweise ist die Steigerung der Harnkallikreinausscheidung nach Orciprenalin durch eine Mehrdurchblutung der Nieren bedingt.

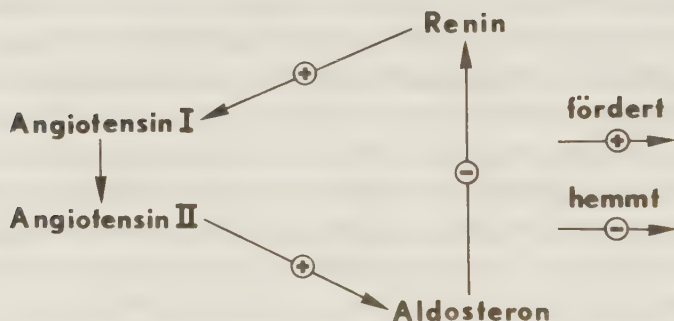
Durch die Infusion von Sympathomimetika bei Hunden konnte eine Steigerung der Harnkallikreinausscheidung herbeigeführt werden. Angiotensin II ist für seine starke blutdrucksteigernde Wirkung bekannt, die etwa 40-mal stärker sein soll, als diejenige von Noradrenalin.⁹⁾ Es war daher naheliegend zu vermuten, eine Infusion von Angiotensin II könnte zu einer Steigerung der Harnkallikreinausscheidung führen. Dies war jedoch nicht der Fall. Bei den beiden durchgeführten Versuchen wurde eine Senkung der stündlichen Kallikreinausscheidung im Harn nach Angiotensin II-Infusionen im einen Fall um 42 %, im anderen um 46 % bewirkt. Demgemäß erhöht Angiotensin II den Blutdruck, führt aber zu einem Absinken der Harnkallikreinausscheidung. Wenn Angiotensin II auch die Bildung von Plasmakallikrein erniedrigen würde, könnte hierin mit ein Grund für den Anstieg des Blutdruckes nach Angiotensin II-Freisetzung gesehen werden. Auffallend sind dennoch Ähnlichkeiten im Kallikrein-Kinin-System und Renin-Angiotensin-System. Renin und Kallikrein werden mit sehr großer Wahrscheinlichkeit in der Niere gebildet. Beide setzen aus Vorstufen niedermolekulare Peptide frei, die den Blutdruck in entgegengesetzter Weise stark zu beeinflussen vermögen. Die Peptide Angiotensin II und Kinine werden sehr schnell inaktiviert. Hiermit wird eine Entgleisung des Blutdruckes durch einen zu hohen Angiotensin II- oder Kinin-Spiegel verhindert. Aufgrund unserer Beobachtung läßt sich vermuten, daß eine enge Wechselwirkung zwischen beiden Systemen besteht, wie dies schon von einigen Autoren^{15) 18)} geäußert wurde.

Margolius et al.¹⁶⁾ fanden eine Erhöhung der Harnkallikreinausscheidung auch bei Patienten mit Hyperaldosteronismus. Geller et al.⁸⁾ beobachteten nach Gaben des Mineralocorticoids Desoxycorticosteron bei Ratten eine Erhöhung der Harnkallikreinausscheidung auf das 3-fache, wogegen adrenaletomierte Ratten

eine stark erniedrigte Kallikreinausscheidung im Harn aufwiesen. Wir konnten beim Hund eine Steigerung der Harnkallikreinausscheidung durch Infusion von 5 µg/min Aldosteron über vier Stunden in einem Fall von 188 %, im anderen Fall von 26 % beobachten. Dieser Effekt wurde deutlicher bei zwei weiteren Versuchen, bei denen zusätzlich zu Aldosteron 0,16 IE/min ACTH infundiert wurden, aus der Überlegung heraus, daß eine hohe Aldosteronzufuhr eine Hemmung der ACTH-Freisetzung aus der Hypophyse bewirken könnte. Beim ersten Versuch mit Aldosteron + ACTH erfolgte eine Zunahme der stündlichen Harnkallikreinausscheidung um 231 %, beim zweiten Versuch um 106 %. Bei den letzten beiden Versuchen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß diese sehr große Steigerung auf der ACTH-Wirkung beruht.

Unter der Voraussetzung, daß Angiotensin II eine Erniedrigung der Harnkallikreinausscheidung bewirkt, wie wir es beobachteten, läßt sich für die Erhöhung der Kallikreinausscheidung durch Aldosteron eine Erklärung finden. Verschiedene Autoren, unter anderem Ganong,^{7) 9)} fordern eine Hemmung der Reninfreisetzung durch Aldosteron. Dies hätte zur Folge, daß vermindert Angiotensin II gebildet wird. Der erniedrigte Angiotensin II-Spiegel führte dann zur vermehrten Kallikreinausscheidung im Harn. Da unter anderem Angiotensin II die Aldosteronsekretion steuert, normalisiert sich so der Aldosteron-Spiegel. Die von Margolius et al.¹⁶⁾ beschriebene erhöhte Kallikreinausscheidung im Harn bei Hyperaldosteronismus könnte durch einen Angiotensin II-Mangel verursacht sein.

Der von Ganong und anderen Autoren^{7) 9)} geforderte Regelkreis ist im folgenden Schema veranschaulicht.



Nach Fütterung von 2 %iger Kochsalzlösung bei 2 Ratten über 8 Tage kam es im Vergleich zu den beiden Kontrolltieren zu einem signifikanten ($p < 0,005$) Absinken der täglichen Harnkallikreinausscheidung. Dies läßt sich durch die Vermutung erklären, daß erhöhte Natriumzufuhr zu einer Erniedrigung des Aldosteronspiegels führt. Beim Menschen besteht eine lineare Beziehung zwischen dem reziproken Wert der Natriumzufuhr und der Aldosteronausschüttung, solange die tägliche Aufnahme von Natrium über 50 mVal liegt.⁷⁾ Insofern scheint also eine Beziehung zwischen Natrium und Kallikrein zu bestehen.

Mehrere Autoren^{1) 29)} fanden einen starken natriuretischen Effekt der Kinine. Die hieraus sich ergebende Vermutung, daß Kallikrein eine natriuretische Wirkung aufweise, konnte also im Tierversuch bei Ratten nicht bestätigt werden. Ebenso ergab sich beim Menschen zwischen der täglichen Kallikrein- und Na-

triumausscheidung bei den 51 untersuchten Harnproben keine Korrelation. Auch nicht für die Elektrolyte, Kalium und Calcium. Es fiel jedoch auf, daß zwischen dem Quotienten $\frac{K^+}{Ca^{++}}$ und der täglichen Harnkalikreinausscheidung beim Menschen bei den 32 untersuchten Harnproben eine Korrelation mit $p < 0,05$ bestand.

E ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß beim Menschen zwischen täglicher Harnkallikreinausscheidung und Metanephrin- sowie Vanillinmandelsäureausscheidung eine Korrelation von $p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$ besteht. Somit liegt die Vermutung nahe, daß eine Erhöhung des Katecholaminspiegels zu einer erhöhten Kallikreinausscheidung im Harn führt. Diese Vermutung konnte durch Versuche bei Ratten und Hunden, bei denen Reserpin, α -Methyl-dopa und Sympathomimetika Anwendung fanden, gefestigt werden.

Weitere den Blutdruck beeinflussende Faktoren wurden auf ihren Einfluß auf die tägliche Harnkallikreinausscheidung überprüft. Erhöhte Natriumzufuhr bei Ratten führte zu einem Absinken der täglichen Harnkallikreinausscheidung. Da sich keine Korrelation zwischen der Ausscheidung der Harnelektrolyte Na^+ , K^+ und Ca^{++} und der Harnkallikreinausscheidung beim Menschen ergab, wurde darauf geschlossen, daß das Absinken der Harnkallikreinausscheidung bei Ratten nach erhöhter Kochsalzzufuhr durch das Absinken des Aldosteronspiegels bedingt sein könnte. Eine Korrelation konnte jedoch zwischen dem Quotienten $\frac{\text{K}^+}{\text{Ca}^{++}}$ im Harn und der täglichen Harnkallikreinausscheidung gefunden werden. Weiter zeigten sich Hinweise, daß Aldosteron die Harnkallikreinausscheidung fördert und Angiotensin II die Harnkallikreinausscheidung erniedrigt. Dies führte zu der Vermutung, daß das Renin-Angiotensin-System mit dem Kallikrein-Kinin-System eng verknüpft ist, und die Harnkallikreinausscheidung wesentlich durch den Regelkreis Renin, Angiotensin II, Aldosteron beeinflusst wird.

LITERATUR

- 1 Barraclough, M. A. and I. H. Mills
clin. Sci. 28, 69 (1965)
- 2 Bergmeyer, H. U.:
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie Weinheim / Bergstraße 1970, Bd. I
- 3 Elliot, A., A. H. Nuzumi, F. R.
Endocrinology, 18, 462 (1934)
- 4 Frey, E. K., H. Kraut und E. Werle:
Kallikrein (Padutin), F. Enke, Stuttgart 1950
- 5 Frey, E. K., H. Kraut, E. Werle, R. Vogel, G. Zickgraf-Rüdel und
I. Trautschold:
Das Kallikrein - Kinin - System und seine Inhibitoren.
F. Enke, Stuttgart 1968
- 6 Fritz, H., I. Trautschold und E. Werle:
Z. physiol. Chem. 342, 253 (1965)
- 7 Ganong, W. F.:
Medizinische Physiologie
Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1972
- 8 Geller, R. G., H. S. Margolius, J. J. Pisano, H. R. Keiser:
Effects of Mineralocorticoids, Altered Sodium Intake,
and Adrenalectomy on Urinary Kallikrein in Rats.
Circulation Research, Vol. XXXI, December 1972
- 9 Goodman, L. S., A. Gilman:
The Pharmacological Basis of Therapeutics.
Collier Macmillan Comp., London, Toronto 1971
- 10 Habermann, E. und W. Klett: Biochem. Z. 346, 133 (1966)
- 11 Heutelbach, H., Dissertation Med. Fakultät, München 1971
- 12 Kraut, H. E. K. Frey, E. Werle:
Z. physiol. Chem. 189, 97 (1930)
- 13 Kuschinsky, G., H. Lüllmann, Thieme Stuttgart 1967

- 14 Kutzbach, C., G. Schmidt Kastner:
Kallikrein from Pig Pancreas
Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.,
Bd. 353 1099 - 1106, 7.1972
- 15 Margolius, S. H., R. Geller, W. de Jong, J. J. Pisano
and A. Sjoerdsma:
Altered Urinary Kallikrein Excretion in Rats with Hypertension
Circulation Research, Vol. XXX 3.1972
- 16 Margolius, S. H., J. J. Pisano, R. Geller, A. Sjoerdsma:
Altered Urinary Kallikrein Excretion in Human Hypertension
The Lancet Nov. 13 1971, pp. 1063 - 1065
- 17 Moriya, H., J. V. Pierce und M. E. Webster:
Ann. N. Y. Acad. Sc. 104, 172 (1963)
- 18 Nustad, K., and L. Pubin:
Subcellular localisation of renin and kininogenase
in the rat kidney.
Br. J. Pharmacol. 40: 326 - 333 (1970)
- 19 Pisano, J. J.: A simple Analysis for Normetanephrine and
Metanephrine in Urine.
Clin. Chim. Acta 5 (1960) 406 - 414
- 20 Pisano, J. J., J. R. Crout, D. Abraham:
Determination of 3-Methoxy-4-Hydroxymandelic Acid in Urine.
Am. J. Clin. Pathol., 34, 293 (1960)
- 21 Romero, F., F. W. Pairent, H. E. Appert, J. M. Howard:
The Twenty-Four Hour Excretion of Trypsin and Trypsinogen
in the Urine
Ann. Surg. 8. (1972)
- 22 Schneider, G.: Aufgabensammlung zur statistischen Methodenlehre,
Seminar für Statistik und Versicherungswissenschaft der Universität
München, München 1954
- 23 Siegenthaler, W.: ^{*}Klinische Pathophysiologie.
Thieme, Stuttgart 1970
- 24 Ther, L., Grundlagen der experimentellen Arzneimittelforschung
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft S. 55 - 66
Stuttgart 1965
- 25 Trautschold, I.: Habilitationsschrift,
Medizinische Fakultät München, 1965

- 26 Trautschold, I., E. Werle: Spektrophotometrische Bestimmung des Kallikreins und seiner Inaktivatoren.
Hoppe-Seyler's Zschr. f. physiol. Chem. S. 48 (1961)
- 27 Trautschold, I., H. Fritz und E. Werle:
in: E. G. Erdös, N. Back und F. Sicuteri (Eds.):
Hypotensive Peptides, Springer, New York 1966, S. 221
- 28 Webster, M. E., J. P. Gilmore:
Am. J.: Physiol. 206, 714, (1964)
- 29 Werle, E., R. Busse, A. Schmal: Klin. Wschr. 46, 1315 (1968)
- 30 Werle, E., R. Busse, A. Schmal: Z. ges. exp. Med. 1948, 168 - 172 (1968)
- 31 Werle, E. und R. Vogel: Arch. int. Pharmacodyn. 126, 171 (1960)
- 32 Willis, L. R., J. H. Ludens, J. B. Hook and H. E. Williamson,
Am. J. Physiol. 217, 1 (1969)
- 33 Wisser, H., D. Stamm:
Untersuchungen zur Bestimmung der 4-Hydroxy-3-methoxy-
mandelsäure (Vanillinmandelsäure) im Urin.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem., 8 Jahrg. 1970/Heft 1
- 34 Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen.
J. R. Geigy AG, Basel 1960
- 35 Handbuch Flammenphotometer Eppendorf,
3. Auflage, Eppendorf Gerätebau Netheler und Hinz GmbH
Hamburg (1968)

Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. E. Werle fühle ich mich für die Stellung des Themas und für seine großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

Herzlichen Dank schulde ich Herrn Cand. med. Max Hutzel für seine sachkundige Hilfe bei der Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 21. 12. 1944 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. Theodor Heutelbach und seiner Ehefrau Liselotte, geb. Riederich, in Bad Wiessee geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Taufkirchen/Vils.

1955 trat ich in das Ludwigs-Gymnasium in München ein.

1957 wechselte ich in das Wittelsbacher Gymnasium in München über, an dem ich 1964 das Abitur bestand.

Im W.S. 1964/65 begann ich mit dem Medizinstudium in München und im W.S. 1969/70 mit dem Zahnmedizinstudium.

Die ärztliche Prüfung bestand ich am 18. 2. 1971 in München.

Am 7. 12. 1971 promovierte ich.

Die Zahnärztliche Prüfung bestand ich am 19. 10. 1973 in München.

Die Bestallung als Zahnarzt erhielt ich am 19. 11. 1973.

Vom 1. 10. 1972 bis 28. 2. 1973 war ich am Institut für klinische Chemie und klinische Biochemie der Universität München als Medizinalassistent tätig.

Seit dem 1. 12. 1973 bin ich in der Chirurgischen Klinik der Universität München als Medizinalassistent beschäftigt.

